

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002年8月8日 (08.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/061074 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 5/10, C07K 14/705, 16/28, A61K 38/00, 45/00, 48/00, A61P 25/00, C12P 21/00, G01N 33/15, 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/00636
- (22) 国際出願日: 2002年1月29日 (29.01.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-22505 2001年1月30日 (30.01.2001) JP  
特願2001-390239 2001年12月21日 (21.12.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 中西 淳 (NAKANISHI, Atsushi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1002号 Ibaraki (JP). 鷺谷 洋司 (SAGIYA, Yoji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ602号 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒104-0028 東京都 中央区 八重洲2丁目8番7号 福岡ビル9階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許

[続葉有]

(54) Title: NOVEL PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規タンパク質およびそのDNA

(57) Abstract: It is intended to provide a novel protein having a neurotransmitter-operative channel activity, a DNA encoding this protein, a method of screening a compound promoting or inhibiting the activity of this protein, compounds obtained by the screening method, etc. More specifically, a protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1; a method/a kit for screening a compound promoting or inhibiting the activity of this protein; compounds promoting or inhibiting the activity of the above protein; and so on.

(57) 要約:

本発明は、神経伝達物質作動性チャネル活性を有する新規タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などの提供を目的とする。

具体的には、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法/スクリーニングキット、及び該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物などを提供する。

WO 02/061074 A1

WO 02/061074 A1



(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明細書

## 新規タンパク質およびそのDNA

## 技術分野

- 5 本発明は、新規な神経伝達物質作動性チャネルタンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などを提供する。

## 背景技術

- 10 神経伝達物質作動性チャネルのファミリーにはセロトニン3型(5-HT<sub>3</sub>)受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)、GABA-A受容体、GABA-C受容体、グリシン受容体、グルタミン酸受容体などが含まれる。これらの多くはN末とC末が細胞外に存在する4回膜貫通型タンパク質が5量体を形成するもので、シナプスにおいて神経伝達物質により作動するイオンチャンネルとして知られる。

- 5-HT<sub>3</sub>受容体は、7つのファミリー(5-HT<sub>1</sub>~5-HT<sub>7</sub>)からなるセロトニン(5-HT)の受容体の一種で、5-HT<sub>3</sub>受容体はリガンド作動性チャネルであるが、その他の5-HT受容体はGタンパク共有型受容体である。5-HT<sub>3</sub>受容体は、現在までに、2種のサブユニット5-HT<sub>3A</sub>受容体(Mol. Pharmacol.、第48巻、407頁、1995年)と5-HT<sub>3B</sub>受容体がクローニングされている(Nature、第397巻、359頁、1999年)。5-HT<sub>3</sub>受容体は、リガンド作動性の非選択的カチオンチャンネルであり、生理的条件下では一過性の膜の脱分極を引き起こす。5-HT<sub>3</sub>受容体遮断薬であるグラニセトロンは嘔吐中枢を抑制することから、シスプラチンなどの抗癌剤による悪心、嘔吐の抑制に用いられる。また、薬理学的解析から5-HT<sub>3</sub>受容体が白血球上に存在することが知られていることや(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、第85巻、4557頁、1988年)、5-HT<sub>3</sub>受容体が免疫細胞の増殖の制御に関わること(Biochem. J.、第344巻、199頁、1999年)などから、5-HT<sub>3</sub>受容体は神経伝達のみならず免疫系の制御にも関与していると考えられている。

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は、ニコチン受容体とも呼ばれるもので、これまでに 9 種類のサブユニットの存在が知られている (Prog. Neurobiol.、第61巻、75頁、2000年)。神経筋接合部に存在する筋肉型と自律神経節や中枢神経に存在する神経型は薬理学的性質が異なり、これはサブユニット構成の違いに起因する (Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.、第40巻、431頁、2000年)。ニコチン性アセチルコリン受容体はニコチン依存症、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病などの重要な薬剤ターゲットに成り得ると考えられている。また、活性化リンパ球においてアセチルコリンの合成や分泌が増加すること、リンパ球にはニコチン性アセチルコリン受容体が発現しており、ニコチン性アゴニストの刺激によりリンパ球で細胞内カルシウムの上昇がみられること (Pharmacology & Therapeutics、第86巻、29頁、2000年) などから、ニコチン性アセチルコリン受容体は免疫系の制御にも関与していると考えられている。

神経伝達物質作動性チャネルは、神経伝達に重要な役割を果たしている。さらに免疫細胞で発現し免疫系の制御にも関わるものもあると考えられている。神経伝達物質作動性チャネルのサブユニットが会合してチャネルを形成する詳しいメカニズムや、その活性化によるイオン透過が各組織においてシグナル伝達に結びつく詳しいメカニズムは不明である。類似の神経伝達物質作動性チャネルの中から、厳密に単一のチャネルに選択性を持つアゴニスト・アンタゴニストの創生が、そのチャネルの性質を解明するのに役立つとともに、各種疾患の治療に結びつくと考えられる。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新規神経伝達物質作動性チャネルタンパク質を見出した。該タンパク質はアミノ酸レベルで、神経伝達物質作動性チャネルタンパク質のひとつであるヒト 5-HT<sub>3A</sub> 受容体と約 20% の相同性を示し、4 回膜貫通型の構造を有しており、神経伝達物質作動性チャネルタンパク質 (例、5-HT の受容体) として機能し得るものである。該タンパク質を抑制する方法としては、例えば、リガンドと



- 該タンパク質との結合を阻害したり、該タンパク質による神経伝達物質作動性チャンネル活性を阻害したり、該タンパク質の転写を抑制して発現レベルを低下させることが考えられる。該タンパク質を賦活化する方法としては、例えば、該タンパク質による神経伝達物質作動性チャンネル活性を促進したり、該タンパク質のプロモーターを活性化したり、mRNAを安定化することで発現レベルを亢進することが考えられる。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

- 10 すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有する上記(1)記載のタンパク質またはその塩、

- 15 (3) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(4) 上記(1)記載のタンパク質または上記(3)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(5) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド、

(6) 配列番号：2で表わされる塩基配列を含有する上記(5)記載のDNA、

- 20 (7) 上記(5)記載のDNAを含有する組換えベクター、

(8) 上記(7)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(9) 上記(8)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質または上記(3)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、

- 25

(10) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(11) 上記(5)記載のDNAを含有してなる医薬、

(12) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチド

またはその塩に対する抗体、

(13) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化

5 合物またはその塩のスクリーニング方法、

(14) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

10 (15) 上記(13)記載のスクリーニング方法または上記(14)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

(16) 上記(15)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

15 (17) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(18) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリー

20 ニング用キット、

(19) 上記(17)記載のスクリーニング方法または上記(18)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(20) 上記(19)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

25 (21) 上記(12)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(22) 上記(12)記載の抗体を含有してなる医薬、

(23) 上記(12)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質の定量方法、

(24) 上記(23)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記

載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断法、

(25) 上記(12)記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 5 (26) 上記(12)記載の抗体を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(27) 上記(25)記載のスクリーニング方法または上記(26)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

- 10 (28) 上記(27)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(29) 中枢神経疾患、消化器疾患、肝臓疾患、循環器疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、胸腺疾患、脾臓疾患、免疫不全若しくは癌の予防・(及び/又は)治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、または抗癌剤治療による副作用の抑制剤である上記(10)、(11)、(16)、(20)、

- 15 (22) または(28)記載の医薬、

(30) 哺乳動物に対して、上記(15)、(19)または(27)記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢神経疾患、消化器疾患、肝臓疾患、循環器疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、胸腺疾患、脾臓疾患、免疫不全若しくは癌の予防・(及び/又は)治療方法、

- 20 臓器移植後の拒絶反応抑制方法、または抗癌剤治療による副作用の抑制方法、

(31) 中枢神経疾患、消化器疾患、肝臓疾患、循環器疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、胸腺疾患、脾臓疾患、免疫不全若しくは癌の予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、または抗癌剤治療による副作用の抑制剤を製造するための上記(15)、(19)または(27)記載の化合物

- 25 またはその塩の使用などを提供する。

さらに、本発明は、

(32) 外来性の、上記(1)記載のタンパク質をコードするDNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

(33) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(32)記載の非ヒト哺乳動

物、

(34) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記(33)記載の非ヒト哺乳動物。

(35) 上記(1)記載のタンパク質をコードするDNAが不活性化されたDNA発現不全非ヒト哺乳動物、

(36) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(35)記載の非ヒト哺乳動物、

(37) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記(35)記載の非ヒト哺乳動物、

10 (38) 上記(5)記載のDNAを含有してなる診断薬などを提供する

#### 図面の簡単な説明

図1は、ヒトTCH065、nAChR  $\alpha 7$  受容体および5-HT3受容体(5-HT3Aおよび5-HT3B)のアミノ酸配列の比較を表す図である。

15 図中、TCH065はヒトTCH065のアミノ酸配列を、nAChR  $\alpha 7$  はnAChR  $\alpha 7$  受容体のアミノ酸配列を、5-HT3Aは5-HT3A受容体のアミノ酸配列を、5-HT3Bは5-HT3B受容体のアミノ酸配列を、Sはシグナル配列を、M1~M4は膜貫通領域を示す。□は、ヒトTCH065に一致するアミノ酸を示す。(図2へ続く)

20 図2は、ヒトTCH065、ニコチン性アセチルコリン受容体および5-HT3受容体(5-HT3Aおよび5-HT3B)のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH065はヒトTCH065のアミノ酸配列を、nAChR  $\alpha 7$  はニコチン性アセチルコリン受容体のアミノ酸配列を、5-HT3Aは5-HT3A受容体のアミノ酸配列を、5-HT3Bは5-HT3B受容体のアミノ酸配列を、Sはシグナル配列を、M1~M4は膜貫通領域を示す。□は、ヒトTCH065に一致するアミノ酸を示す。(図1の続き)

図3は、ヒトTCH065遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。ヒトの各組織cDNA(Human MTC panel IおよびMTC panel IIおよびhuman digestive system MTC

panel : クロンテック社製) におけるヒトTCH065の発現量をTaqMan PCRにより測定した結果を示す。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図4は、ヒトTCH065遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。ヒトの各組織cDNA (Human MTC panel IおよびMTC panel IIおよびhuman digestive system MTC panel : クロンテック社製) におけるヒトTCH065の発現量をTaqMan PCRにより測定した結果を示す。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図5は、ヒトTCH065遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。ヒトの各組織cDNA (Human blood fractions MTC panelおよびhuman fetal MTC panel : クロンテック社製) におけるヒトTCH065の発現量をTaqMan PCRにより測定した結果を示す。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図6は、ヒトTCH065遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。ヒトの各組織cDNA (Human blood fractions MTC panelおよびhuman fetal MTC panel : クロンテック社製) におけるヒトTCH065の発現量をTaqMan PCRにより測定した結果を示す。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図7は、ヒトTCH065遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。ヒトの各組織cDNA (Human tumor MTC panelおよびhuman immune system MTC panel : クロンテック社製) におけるヒトTCH065の発現量をTaqMan PCRにより測定した結果を示す。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図8は、ヒトTCH065遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。ヒトの各組織cDNA (Human tumor MTC panelおよびhuman immune system MTC panel : クロンテック社製) におけるヒトTCH065の発現量をTaqMan PCRにより測定した結果を示す。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

### 発明を実施するための最良の形態

- 本発明で用いられる配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質
- 5 または本発明で用いられるタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー
- 10 細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、
- 15 大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

- 20 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約30%以上、好ましくは約50%以上、より好ましくは約70%以上、特に好ましくは約80%以上、最も好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有
- 25 するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、神経伝達物質作動性チャネル活性化

5 などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、神経伝達物質作動性チャネル活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

神経伝達物質作動性チャネル活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができ、例えば、J. Biol. Chem. 275巻, 5620-5625頁, 2000年に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、①配列番号：1で  
10 表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1  
15 で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1  
20 で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1  
25 で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、とくに限定されない。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）のいずれであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するヒト由来のタンパク質などがあげられる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で



用いられるタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも  
5 も20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）  
10 のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸  
15 配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

本発明の部分ペプチドとしては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、例えば第24番目～第230番目のアミノ酸配列を有するペプチドなど  
20 があげられる。なかでも、好ましくは第100番目～第120番目、第210番目～第230番目、第391番目～第411番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどがあげられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明で  
25 用いられるタンパク質のごとく、C末端がアミド（ $\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $\text{COOR}$ ）であってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミ

ノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

- 5 本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。たとえば、後述する本発明の抗体を調製する目的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、例えば第24番目～第230番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどがあげられる。なかでも、好ましくは第100番目～第120番目、第210  
10 番目～第230番目、第391番目～第411番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどがあげられる。

- 本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様  
15 な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- 本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、  
20 前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

- ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織  
25 または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることがで

きる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリル  
5 アミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に  
10 樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボ  
15 ジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'- (3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt, HOOBt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護ア  
20 ミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン  
25 化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られ

ている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（ $\text{C}_{1-6}$ ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキ

シー 2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、  
5 2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

- 10 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、  
15 一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなりガンド作動性カチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒス  
20 チジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

- 25 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した

- 後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。
- 5 縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。
- 10

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

- 15 本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の（a）～（e）に記載された方法が挙げられる。
- 20

（a）M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス（Peptide Synthesis）、Interscience Publishers, New York（1966年）

- 25 （b）SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド（The Peptide）、Academic Press, New York（1965年）

（c）泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）（1975年）

（d）矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学Ⅳ、205、（1977年）

(e) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペ  
5 プチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するもので  
10 あればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織  
15 よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列  
20 番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明で用いられるタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリ  
25 ダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と約30%以上、好ましくは約50%以上、さらに好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、特に好ましくは約80%以上、最も好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、

- モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。
- 5

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

- 10 より具体的には、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

- 本発明で用いられる部分ペプチドをコードする DNA としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであれば
- 15 いかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。

- 本発明で用いられる部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号：2 で表される塩基配列を有する DNA の一部分を有する DNA、また
- 20 は配列番号：2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする DNA の一部分を含有する DNA などが用いられる。

- 配列番号：2 で表される塩基配列とハイブリダイズできる DNA は、前記と
- 25 同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードする DNA のクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタ



ンパク質と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

- DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km (宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。
- 15 クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

- 25 ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pX

T1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞  
5 を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、  
10 trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿  
15 主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いること  
20 ができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdh  
25 fr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、

$\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

- 5     このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ
- 10   (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal
- 15 of Molecular Biology)], 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440 (1954)] などが用いられる。

- バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis)
- 20   MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。

- 酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20
- 25   B-12, シゾサッカロマイセス ポンペ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036, ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの

中腸由来のMG 1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該S f細胞としては、例えば、S f 9細胞 (ATCC  
5 CRL1711)、S f 2 1細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズ  
10 ハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAt T-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・  
15 ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

パチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネ  
20 ラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユー  
25 エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

- このようにして、タンパク質をコードする DNA を含有する発現ベクターで
- 5 形質転換された形質転換体を得ることができる。

- 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素
- 10 源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5~8 が望ましい。

- 15 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 $\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。
- 20

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15~43℃ で約 3~24 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 30~40℃ で約 6~24 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。
- 25

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77 巻, 4505 (1980)]

や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は  
5 通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。  
10 培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)〕, DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 39  
15 6 (1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)〕な  
20 どが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。  
25

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適

宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- 5      このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。
- 10

- 15      かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- 20      なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

- 25      かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであつてもよい。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

5

#### 〔モノクローナル抗体の作製〕

##### （a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG600



0) が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

## 25 (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗

体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法]に従って行なうことができる。

[ポリクローナル抗体の作製]

- 5 本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(タンパク質抗原)自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

- 10 温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、
- 15 約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

- 20 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

- ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、
- 25 好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、アンチセンスヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアンチセンスヌクレオチドが好適である。

具体的には、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のタンパク質遺  
5 伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることがで  
10 きるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応  
15 する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピ  
20 ンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチ  
25 ドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但

- し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド (または非修飾オリゴヌクレオチド)、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合 (例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど) を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合 (例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど) を持つもの、例えばタンパク質 (ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど) や糖 (例えば、モノサッカライドなど) などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物 (例えば、アクリジン、ソラレンなど) を持つもの、キレート化合物 (例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など) を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの (例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など) であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド (核酸) は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸 (RNA、DNA) である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、そ

- れに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチ
- 5 センス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

- 10 本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との
- 15 相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド
- 20 結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護
- 25 基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本

- 発明のタンパク質と略記する場合がある)、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)、および本発明のDNAのアンチセンスヌクレオチド(以下、本発明のアンチセンスヌクレオチドと略記する場合がある)の用途を説明する。

- 本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば、神経伝達物質作動性チャネル活性を抑制することで、例えば、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など)、消化器疾患(例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など)、肝臓疾患(例、肝炎、肝硬変など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群など)、炎症性疾患(例、慢性閉塞性肺疾患など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、胸腺疾患、脾臓疾患(例、脾機能亢進症など)、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、癌(例、脾臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などとして使用することができる。

- 一方、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば、神経伝達物質作動性チャネル活性を促進することで、例えば、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など)、消化器疾患(例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など)、肝臓疾患(例、肝炎、肝硬変など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群など)、炎症性疾患(例、慢性閉塞性肺疾患など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、

- 全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、胸腺疾患、脾臓疾患(例、脾機能亢進症など)、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、癌(例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などとして使用することができる。

〔1〕本発明のタンパク質が関与する各種疾病の治療・予防剤

- 10 本発明のタンパク質は、神経伝達物質作動性チャネル活性を有し、神経伝達物質によるシグナル伝達に重要な役割を果たしている。

- したがって、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合あるいは本発明のタンパク質の発現量が減少している場合には、例えば、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など)、消化器疾患(例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など)、肝臓疾患(例、肝炎、肝硬変など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群など)、炎症性疾患(例、慢性閉塞性肺疾患など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、胸腺疾患、脾臓疾患(例、脾機能亢進症など)、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、癌(例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などの種々の疾患が発症する。

したがって、本発明のタンパク質および本発明のDNAは、例えば、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など)、消化器疾患(例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など)、肝臓疾患(例、肝炎、肝硬変など)、循環器疾患



(例、心不全、不整脈、QT延長症候群など)、炎症性疾患(例、慢性閉塞性肺疾患など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、胸腺疾患、脾臓疾患(例、脾機能亢進症など)、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、癌(例、脾臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、神経伝達物質作動性チャネル活性が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のタンパク質等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセ

ル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤  
5 などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性  
10 セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のた  
15 めの無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、  
20 ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジ  
25 ルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンブ

ルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、自己免疫疾患の治療目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき該タンパク質等を約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、自己免疫疾患の治療目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人（体重60 kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質等を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

## 20 {2} 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、1) 本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、神経伝達物質作動性チャネル活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、例えば、

(2) (i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の神経伝達物質作動性チャネル活性と (ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の神経伝達物質作動性チャネル活性の比較を行なうこと

を特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(ii)の場合において、神経伝達物質作動性チャネル活性をパッチ・クランプ法で測定し、神経伝達物質作動性チャネル活性の指標として比較することを特徴とするものである。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

10 上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の神経伝達物質作動性チャネル活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

15 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質  
20 転換体が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質の神経伝達物質作動性チャネル活性は、公知の方法、例えば、J. Biol. Chem. 275巻, 5620-5625頁, 2000年に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

例えば、上記(ii)の場合における神経伝達物質作動性チャネル活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

また、例えば、上記(ii)の場合における神経伝達物質作動性チャネル活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より

好ましくは約50%以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

また、本発明のタンパク質遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、上記の各種細胞に発現させ、該細胞に上記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質の発現を促進または抑制（すなわち、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、（3）本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

（4）（iii）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と（iv）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法においては、例えば、（iii）と（iv）の場合における、本発明のタンパク質遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量）を測定して、比較する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッ

ファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の神経伝達物質作動性チャンネル活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

本発明のタンパク質遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロットティングやReverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)、リアルタイムPCR解析システム（ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction）などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記（iv）の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現量を、上記（iii）の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記（iv）の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現量を、上記（iii）の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、（5）本発明の抗体を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、

阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

- (6) (v) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と  
(vi) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物  
5 を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

- 上記スクリーニング方法においては、例えば、(v) と (vi) の場合における、  
本発明のタンパク質の発現量(具体的には、本発明のタンパク質量)を抗体を用いて測定(例、本発明のタンパク質の発現を検出、本発明のタンパク質の発  
10 現量を定量等)して、比較する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 15 上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。  
バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約6~8)のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の神経伝達物質作動性チャンネル活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

- 20 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主(形質転換体)が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質  
25 転換体が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

例えば、上記 (vi) の場合における本発明のタンパク質の発現量を、上記 (v) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

- 5     例えば、上記 (vi) の場合における本発明のタンパク質の発現量を、上記 (v) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

- 10    本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

- 15    本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性（例、神経伝達物質作動性チャネル活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

- 20    本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機
- 25



能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などの医薬として有用である。

- 5      また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などの医薬として有用である。
- 10
- 15

- 本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、
- 20      中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、膵臓癌、肺癌、
- 25

腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などの医薬として有用である。

- また、本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、
- 5 例えば、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、膵臓癌、
- 10 肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などの医薬として有用である。
- 15

- 本発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮
- 20
- 25

頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などの医薬として有用である。

また、本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など)、消化器疾患(例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など)、肝臓疾患(例、肝炎、肝硬変など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群など)、炎症性疾患(例、慢性閉塞性肺疾患など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、胸腺疾患、脾臓疾患(例、脾機能亢進症など)、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、癌(例、脾臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などの医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、自己免疫疾患治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.

0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、自己免疫疾患治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

10 【3】本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

15 (i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

25 また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定  
5 法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、  
10 例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例  
15 えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用  
20 いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体  
25 を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらし行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体ある

いは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の

条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

- 例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、
- 5 入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」
- 10 Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical
- 15 Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

- さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の減少が検出された場合、例えば、中枢
- 20 神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など)、消化器疾患(例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など)、肝臓疾患(例、肝炎、肝硬変など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群など)、炎症性疾患(例、慢性閉塞性肺疾患など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬
- 25 化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、胸腺疾患、脾臓疾患(例、脾機能亢進症など)、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、癌(例、脾臓癌、肺癌、腎

臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など) など、臓器移植後の拒絶反応、抗癌剤治療による副作用などが発症している可能性が高いと診断することができる。反対に、例えば、本発明のタンパク質の濃度の上昇が検出された場合、例えば、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など)、消化器疾患(例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など)、肝臓疾患(例、肝炎、肝硬変など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群など)、炎症性疾患(例、慢性閉塞性肺疾患など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、胸腺疾患、脾臓疾患(例、脾機能亢進症など)、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、癌(例、脾臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など) などである、または、臓器移植後の拒絶反応、抗癌剤治療による副作用などが発症している可能性が高いと診断することが出来る。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

#### 〔4〕遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNA



Aの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5  
5 巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

10 例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現増加が検出された場合、例えば中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、  
15 慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、  
20 脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、脾臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）などである、または、臓器移植後の拒絶反応、抗癌剤治療による副作用などが発症している可能性が高いと診断することが出来る。反対に、発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNA  
25 の突然変異が検出された場合は、例えば、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患

(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、胸腺疾患、脾臓疾患(例、脾機能亢進症など)、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、癌(例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などである、または臓器移植後の拒絶反応、抗癌剤治療による副作用などが発症している可能性が高いと診断することができる。

10

#### 〔5〕 アンチセンスヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能(例、神経伝達物質作動性チャネル活性)を抑制することができるので、例えば、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など)、消化器疾患(例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など)、肝臓疾患(例、肝炎、肝硬変など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群など)、炎症性疾患(例、慢性閉塞性肺疾患など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など)、胸腺疾患、脾臓疾患(例、脾機能亢進症など)、免疫不全(例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など)、癌(例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などとして使用することができる。

25

上記アンチセンスヌクレオチドを上記の治療・予防剤として使用する場合、

公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

- 例えば、該アンチセンスヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入
- 5 した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。
- 10 該アンチセンスヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、自己免疫疾患の治療の目的で本発明のアンチセンスヌクレオチドを関節に局所投与する場合、一般的に成人（体重60 kg）においては、一日につき該アンチセンスヌクレオチドを約0.1～100 mg投与する。
- 15 さらに、該アンチセンスヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

さらに、本発明は、

- ①本発明のタンパク質をコードするRNAの一部とそれに相補的なRNAを含有する二重鎖RNA、
- 20 ②前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、
- ③本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、
- ④前記リボザイムを含有してなる医薬、
- ⑤前記リボザイムをコードする遺伝子（DNA）を含有する発現ベクターなども提供する。
- 25

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、二重鎖RNA、リボザイムなども、本発明のDNAから転写されるRNAを破壊またはその機能を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑制することができるので、例えば、中枢神経疾患（例、

- アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、
- 5 自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常
- 10 にともなう免疫不全など）、癌（例、脾臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などとして使用することができる。

- 二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、
- 15 て、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

- リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、公知のリボザイムの配列の一部を本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に置換することによって製造することができる。
- 20 本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得るコンセンサス配列NUX（式中、Nはすべての塩基を、XはG以外の塩基を示す）の近傍の配列などが挙げられる。

- 上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。また、前記⑤の発現ベクターは、公知の遺伝子治療法などと同様に用い、
- 25 上記予防・治療剤として使用する。

#### 〔6〕本発明のDNAを有する動物の作出

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明

の外来性DNAと略記する) またはその変異DNA (本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある) を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- 5 (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。

- 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物 (以下、
- 10 本発明のDNA導入動物と略記する) は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階 (さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前) に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DE
  - 15 AE-デキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することができる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出すること
  - 20 ともできる。

- 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス (例えば、純系として、
- 25 C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など) またはラット (例えば、Wistar, SDなど) などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入するにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入する場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはパキューロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムス

ター、ラット、マウスなど) 由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリン I I、ウロプラキン I I、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子  $\beta$ 、ケラチン K 1, K 10 および

5 K 14、コラーゲン I 型および I I 型、サイクリック AMP 依存タンパク質キナーゼ  $\beta$  I サブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ (一般に Tie 2 と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン 3 リン酸化酵素 (Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネイン I および I I A、メタロプロティナーゼ 1 組織インヒビター、MHC クラス I 抗原 (H-2 L)、H-ras、レニン、ドーパミン  $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、ポリペプチド鎖延長因子 1  $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ )、 $\beta$  アクチン、 $\alpha$  および  $\beta$  ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖 1 および 2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H 鎖可変部 (VN

10 P)、血清アミロイド P コンポーネント、ミオグロビン、トロポニン C、平滑筋  $\alpha$  アクチン、プレプロエンケファリン A、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子 1  $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ ) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ  $\beta$  アクチンプロモーターなどが好適である。

20 上記ベクターは、DNA 導入哺乳動物において目的とする mRNA の転写を終結する配列 (一般にターミネターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各 DNA の配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスの SV 40 ターミネターなどが用いられる。

25 その他、目的とする外来性 DNA をさらに高発現させる目的で各 DNA のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核 DNA のイントロンの一部などをプロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の 3' 下流 に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物 (例えば、

ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを導入した非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように



繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発  
現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に  
本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物  
5 として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物を用いて、  
本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質に関連する疾患の病  
態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明の  
タンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患  
10 に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外  
来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼  
育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述の  
プラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのD  
15 NAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができ  
る。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚  
芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出  
動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子  
孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有すること  
20 を意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その  
胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相  
同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配す  
ることによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができ  
る。

25 本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発  
現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に  
本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル  
動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用  
いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの

疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

5    る。

また、本発明の外来異常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質またはその機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、  
10   例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析する、  
またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性

15    についての解析、

③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

20    ⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該

25    疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、ま

たはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

10

#### 〔7〕 ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 15 (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された上記（1）記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である上記（1）記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の胚幹細胞、
- 20 (5) ゲッ歯動物がマウスである上記（4）記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる上記（6）記載の非ヒト哺乳動物、
- 25 (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（6）記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである上記（8）記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 上記（7）記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を

促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、あるいは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なmRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノ

ックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常

数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体  
5 発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。  
例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-10000\text{ U/ml}$ ）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常  
10  $0.001-0.5\%$ トリプシン/ $0.1-5\text{ mM EDTA}$ 、好ましくは約0.1%トリプシン/ $1\text{ mM EDTA}$ ）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

15 ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエス  
20 エー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

25 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製

したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配によ

り得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

- 10 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因

- 15 究明及び治療法の検討に有用である。

〔7a〕本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

- 20 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 25

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿な



どがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 10 例えば、慢性関節リウマチに対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の関節の腫れの体積などを経時的に測定したり、エックス線、MRI、組織学的手法などにより関節破壊の程度を経時的に評価する。

- 15 該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 20 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、25 ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 5     該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）の慢性関節リウマチの患者においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与
- 10    量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）の慢性関節リウマチの患者に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与す
- 15    ることができる。

〔7b〕本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

- 本発明は、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、
- 20    レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 上記スクリーニング方法において、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明
- 25    の DNA がレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明の DNA に対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、β-ガラクトシダ

ーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド (X-gal) のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、有機酸など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用

いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候  
5 群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢  
10 性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、脾臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀  
15 胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などの医薬として有用である。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害する  
20 ことができるので、例えば中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、  
25 糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、

膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などの医薬として有用である。

- 5 さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 10 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどに  
15 より差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の慢性関節リウマチ患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。  
非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患など  
20 によっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の慢性関節リウマチ患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり  
25 に換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の慢性関節リウマチ患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に

投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の慢性関節リウマチ患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.

- 5 1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

- 10 このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

- 15 また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子導入動物）を作出すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

- 20 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

- 25 DNA : デオキシリボ核酸  
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸  
A : アデニン  
T : チミン  
G : グアニン

	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
5	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
10	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
15	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
20	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
25	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン

G l n : グルタミン

p G l u : ピログルタミン酸

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

- |    |                      |                                   |
|----|----------------------|-----------------------------------|
| 5  | M e                  | : メチル基                            |
|    | E t                  | : エチル基                            |
|    | B u                  | : ブチル基                            |
|    | P h                  | : フェニル基                           |
|    | T C                  | : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基          |
| 10 | T o s                | : p-トルエンスルフォニル                    |
|    | CHO                  | : ホルミル                            |
|    | B z l                | : ベンジル                            |
|    | Cl <sub>2</sub> -Bzl | : 2, 6-ジクロロベンジル                   |
|    | B o m                | : ベンジルオキシメチル                      |
| 15 | Z                    | : ベンジルオキシカルボニル                    |
|    | C l - Z              | : 2-クロロベンジルオキシカルボニル               |
|    | B r - Z              | : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル               |
|    | B o c                | : t-ブトキシカルボニル                     |
|    | D N P                | : ジニトロフェニル                        |
| 20 | T r t                | : トリチル                            |
|    | B u m                | : t-ブトキシメチル                       |
|    | F m o c              | : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル             |
|    | H O B t              | : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール                |
|    | H O O B t            | : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-        |
| 25 |                      | 1, 2, 3-ベンゾトリアジン                  |
|    | H O N B              | : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド |
|    | D C C                | : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド           |

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。



[配列番号：1]

ヒトTCH065タンパク質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するTCH065タンパク質を

5 コードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：3]

実施例1で用いられたプライマーA7の塩基配列を示す。

[配列番号：4]

実施例1で用いられたプライマーB5の塩基配列を示す。

10 [配列番号：5]

実施例1で用いられたプライマーA6の塩基配列を示す。

[配列番号：6]

実施例1で用いられたプライマーSP6の塩基配列を示す。

[配列番号：7]

15 実施例1で用いられたプライマーT7の塩基配列を示す。

[配列番号：8]

実施例1で用いられたプライマーA2の塩基配列を示す。

[配列番号：9]

実施例1で用いられたプライマーB2の塩基配列を示す。

20 [配列番号：10]

実施例1で用いられたプライマーF1の塩基配列を示す。

[配列番号：11]

実施例1で用いられたプライマーF2の塩基配列を示す。

[配列番号：12]

25 実施例1で用いられたプライマーR1の塩基配列を示す。

[配列番号：13]

実施例1で取得したヒトTCH065全長遺伝子を含むcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：14]

実施例2で用いられたプライマーA8の塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

実施例2で用いられたプライマーB8の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

- 5 実施例2で用いられたTaqManプローブT1の塩基配列を示す。

- 後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) TOP10/pCR-BIuntII-TCH065は、2002年1月23日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7862として、2002年1月10日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 (郵便番号532-8686) の財団法人発酵研究所 (IFO) に受託番号IFO 16743として寄託されている。
- 10

## 15 実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

## 20 実施例1

ヒトTCH065遺伝子cDNAのクローニング

2種のプライマーDNA、プライマーA7 (配列番号：3) およびプライマーB5 (配列番号：4) を用いて、ヒト胸腺Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) に対して、まず、Advantage 2 DNA Polymerase (クロンテック社製)

- 25 により、以下の条件(1)～(5)で一次PCRを行った。

- (1) 94℃ 3分間
- (2) 94℃ 5秒間－72℃ 3分間を5サイクル
- (3) 94℃ 5秒間－70℃ 3分間を5サイクル
- (4) 94℃ 5秒間－68℃ 3分間を5サイクル

(5) 70℃ 10分間

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーA6（配列番号：5）とプライマーB5（配列番号：4）を用いて、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）により以下の条件(6)～(10)でnested PCRを行った。

5 (6) 94℃ 2分間

(7) 94℃ 5秒間－72℃ 4分間を5サイクル

(8) 94℃ 5秒間－70℃ 4分間を5サイクル

(9) 94℃ 5秒間－68℃ 4分間を25サイクル

(10) 72℃ 10分間

10 得られた増幅産物をZero Blunt TOPO Cloning kit（インビトロジェン社製）を用いてクローニングし、プラスミドpCR-Blunt II-TCH065を得た。

これをプライマーDNA〔プライマーSP6（配列番号：6）、プライマーT7（配列番号：7）、プライマーA2（配列番号：8）、プライマーB2（配列番号：9）、プライマーF1（配列番号：10）、プライマーF2（配列番号：11）、プライマーR1（配列番号：12）〕およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、取得したプラスミドは1429個の塩基配列を有していた（配列番号：13）。該cDNA断片には411個のアミノ酸配列（配列番号：1）がコードされており（配列番号：2）、該アミノ酸配列を含有するタンパク質を、ヒトTCH065タンパク質と命名した。

25 該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）TOP10/pCR-Blunt II-TCH065と命名した。

Blast P〔ヌクレイック アシッド リサーチ（Nucleic Acids Res.）第25巻、3389頁、1997年〕を用いてOWLに対してホモロジー検索を行ったところ、該cDNAは5-HT3受容体またはニコチン性アセチルコ

リン受容体に属する新規遺伝子であることが判明した（図1および図2）。ヒトで報告されている5-HT<sub>3</sub>受容体である5-HT<sub>3A</sub>受容体（Mol. Pharmacol.、第48巻、407頁、1995年）とはアミノ酸レベルで20%、5-HT<sub>3B</sub>受容体（Nature、第397巻、359頁、1999年）とはアミノ酸レベルで17%の  
5 相同性を示し、ヒトで報告されているニコチン性アセチルコリン受容体の一種であるnAChR  $\alpha 7$ 受容体（FEBS Lett.、第400巻、309頁、1997年）とはアミノ酸レベルで17%の相同性を示し、該タンパク質は4回膜貫通型の構造を有すると推測された。

## 10 実施例2

### ヒトTCH065遺伝子産物の組織分布の解析

ヒトTCH065の配列から設計した、2種のプライマーDNA、プライマーA8（配列番号：14）およびプライマーB8（配列番号：15）と、TaqManプローブT1（配列番号：16）を用いて、ヒトの各組織のcDNA  
15 におけるヒトTCH065の発現量をTaqMan PCRにより測定した。

反応は、TaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、  
20 同時に検出を行った。測定に用いたヒトの各組織のcDNAを〔表1〕に示す。

[表1]

cDNA (いずれもクロンテック社製)	組	織
Human MTC panel I	心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓	
Human MTC panel II	脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、末梢血白血球	
Human digestive system MTC panel	肝臓、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、回盲部、盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、直腸	
Human blood fractions MTC panel	単核球、活性化単核球、休止CD8 <sup>+</sup> T細胞、活性化CD8 <sup>+</sup> T細胞、休止CD4 <sup>+</sup> T細胞、活性化CD4 <sup>+</sup> T細胞、休止CD19 <sup>+</sup> 細胞、活性化CD19 <sup>+</sup> 細胞、休止CD14 <sup>+</sup> 細胞	
Human fetal MTC panel	胎児脳、胎児肺、胎児肝臓、胎児腎臓、胎児心臓、胎児骨格筋、胎児脾臓、胎児胸腺	
Human tumor MTC panel	乳癌 (GI-101)、肺癌 (LX-1)、結腸癌 (CX-1)、肺癌 (GI-117)、前立腺癌 (PC3)、結腸癌 (GI-112)、卵巣癌 (GI-102)、膀胱癌 (GI-103)	
Human immune system MTC panel	脾臓、リンパ節、胸腺、扁桃、骨髓、胎児肝臓、末梢血白血球	

結果を図3、図4、図5、図6、図7および図8に示す。

ヒトTCH065遺伝子産物(mRNA)は、Human MTC panel IおよびMTC panel IIにおいては、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、精巣、卵巣でわずかな発現が見られ、心臓、脳、胸腺で若干の発現が見られ、小腸、大腸、白血球で強い発  
5 現が見られた。

Human digestive system MTC panelにおいては、食道でわずかな発現が見られ、胃から直腸まですべての部位で強い発現が見られた(回腸で特に強い発現が見られた)。また、肝臓でも発現が見られた。

Human blood fractions MTC panelにおいては、いずれの休止状態の白血球でも強い発現が見られた。CD4<sup>+</sup>T細胞では活性化に伴う顕著な発現の上昇が見られた。単核球、CD8<sup>+</sup>T細胞、CD19<sup>+</sup>細胞では活性化により発現の減少が見られた。  
10

Human fetal MTC panelにおいては、胎児心臓でわずかな発現が見られ、胎児脳、胎児肺、胎児肝臓、胎児腎臓、胎児骨格筋、胎児脾臓で若干の発現が見られ、胎児胸腺で強い発現が見られた。

Human tumor MTC panelにおいては、肺癌、結腸癌、前立腺癌で若干の発現が見られた。  
15

Human immune system MTC panelにおいては脾臓、扁桃、骨髄で若干の発現が見られ、リンパ節、胸腺、胎児肝臓で強い発現が見られ、末梢血白血球で特に強い発現が見られた。

20

#### 産業上の利用可能性

本発明のタンパク質、ポリヌクレオチドおよび抗体などは、例えば中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など)、消化器疾患(例、潰瘍、大腸炎、  
25 クロウン病、過敏性腸症候群など)、肝臓疾患(例、肝炎、肝硬変など)、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群など)、炎症性疾患(例、慢性閉塞性肺疾患など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー疾患(例、気管支喘息、花粉症、

- アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）など、臓器移植後の拒絶反応、抗癌剤治療による副作用などの診断マーカー等として有用である。該タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体などを用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害する化合物などは、
- 5 例えば、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病、記憶障害、頭痛、うつ病、薬物依存症など）、消化器疾患（例、潰瘍、大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群など）、肝臓疾患（例、肝炎、肝硬変など）、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群など）、炎症性疾患（例、慢性閉塞性肺疾患など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー疾患（例、気管支喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎など）、胸腺疾患、脾臓疾患（例、脾機能亢進症など）、免疫不全（例、白血球異常、脾機能不全または胸腺異常にともなう免疫不全など）、癌（例、膵臓癌、
- 10 肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など）などの予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、抗癌剤治療による副作用の抑制剤などとして使用することができる。
- 15
- 20

## 請求の範囲

1. 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 5 2. 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有する請求項1 記載のタンパク質またはその塩。
3. 請求項1 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
4. 請求項1 記載のタンパク質または請求項3 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 10 5. DNAである請求項4 記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：2 で表わされる塩基配列を含有する請求項5 記載のDNA。
7. 請求項5 記載のDNAを含有する組換えベクター。
8. 請求項7 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
9. 請求項8 記載の形質転換体を培養し、請求項1 記載のタンパク質または請求項3 記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1 記載のタンパク質もしくは請求項3 記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。
- 15 10. 請求項1 記載のタンパク質もしくは請求項3 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。
- 20 11. 請求項5 記載のDNAを含有してなる医薬。
12. 請求項1 記載のタンパク質もしくは請求項3 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
13. 請求項1 記載のタンパク質もしくは請求項3 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項1 記載のタンパク質もしくは請求項3 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 25 14. 請求項1 記載のタンパク質もしくは請求項3 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項1 記載のタンパク質もしくは請求項3 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のス



クリーニング用キット。

15. 請求項 1 3 記載のスクリーニング方法または請求項 1 4 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 3 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。
16. 請求項 1 5 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
17. 請求項 4 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 10 18. 請求項 4 記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
19. 請求項 1 7 記載のスクリーニング方法または請求項 1 8 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。
- 15 20. 請求項 1 9 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
21. 請求項 1 2 記載の抗体を含有してなる診断薬。
22. 請求項 1 2 記載の抗体を含有してなる医薬。
23. 請求項 1 2 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の定量方法。
- 20 24. 請求項 2 3 記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断法。
25. 請求項 1 2 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 25 26. 請求項 1 2 記載の抗体を含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
27. 請求項 2 5 記載のスクリーニング方法または請求項 2 6 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

28. 請求項27記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

29. 中枢神経疾患、消化器疾患、肝臓疾患、循環器疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、胸腺疾患、脾臓疾患、免疫不全若しくは癌の予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、または抗癌剤治療による副作用の抑制剤である請求項10、請求項11、請求項16、請求項20、請求項22または請求項28記載の医薬。
- 5

30. 哺乳動物に対して、請求項15、請求項19または請求項27記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢神経疾患、消化器疾患、肝臓疾患、循環器疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、

- 10 胸腺疾患、脾臓疾患、免疫不全若しくは癌の予防・治療方法、臓器移植後の拒絶反応抑制方法、または抗癌剤治療による副作用の抑制方法。

31. 中枢神経疾患、消化器疾患、肝臓疾患、循環器疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患、胸腺疾患、脾臓疾患、免疫不全若しくは癌の予防・治療剤、臓器移植後の拒絶反応抑制剤、または抗癌剤治療による副作用の抑制

- 15 剤を製造するための請求項15、請求項19または請求項27記載の化合物またはその塩の使用。

1 / 08

X 1

1 M A L W S L L H L T F L G F S I T L L V H G Q G F Q G T A A I W P S L F N V N - - L S K K V Q E S T C H 0 6 5  
 1 M R C S P - G G V - W - - L A L A A S L L H V S L Q G E F Q R - - - - K L Y K E L V K N Y N P L n a C h r a l p h a 7  
 1 M L L W V Q Q A L - L A - L L L P T L L A Q G E A R R S R N T T R P A L L R L S D Y L L T N Y R K G 5 - H T 3 A  
 1 M L S S V M A P L - W A C I L V A A G I L A T D T H H P Q D S - - A L Y H L S K Q L L Q K Y H K E 5 - H T 3 B

49 I Q I P N M G S A P I L L V D V R V V S N V F N V D I L R Y T M S S M L L L R L S W L D T R R L A W N T C H 0 6 5  
 41 E R P V A N D S Q P L T V Y F S L S L Q I M D V D E K K N Q V L T T N I M L Q M S W T D H Y L L Q W N n a C h r a l p h a 7  
 49 V R P V R D W R K P T T V S I D V I V Y A I L N V D E K K N Q V L T T Y I W Y R Q Y M T D E F L Q W N 5 - H T 3 A  
 47 V R P V Y N W T K A T T V Y L D L E V H A I L D V D A E N Q I L K T S V W Y Q E V W E D H F L S W N 5 - H T 3 B

99 T S A H P R - H A I T L P W H S L M T P R L T L L E A L W V D W R D Q S P - - Q A R V D Q D G H V T C H 0 6 5  
 91 V S E Y P G V K T V R F P D G Q I W K P D D I L L - - Y N S A D E R F D A T F H T N V L V N S S G H C n a C h r a l p h a 7  
 99 P E D E N I T K L S I P T D S I M V P D I L I N E F V D V G K S P N I P Y - - V Y I R H Q G E Y 5 - H T 3 A  
 97 S M P D E I R E I S L P L S A I W A P D I I I N E F V D I E R Y P D L P Y - - V Y V N S S G T I 5 - H T 3 B

145 K L N L A L T T E T N C N F E L L L H F P R D H S N C S L S F Y A L S N T A M E L E F Q A - H V V N E T C H 0 6 5  
 139 Q Y L P P G I F K S S C Y I D V R W F P F D V Q E C K L K F G S W S Y G G W S L D L Q M - - - - n a C h r a l p h a 7  
 146 Q N Y K P L Q V V T A C S L D I Y N F P F D V Q N C S L T F T S W L H T I Q D I N I S L W R L P H K 5 - H T 3 A  
 144 E N Y K P I Q V V S A C S L E T T Y A F P F D V Q N C S L T F F K S I L H T V E D V D L A F L R S P E D 5 - H T 3 B

194 I V S V K R R E Y V V - - - - Y D L K T Q V P P Q Q L V P C F Q V T L R L K N T A L K T C H 0 6 5  
 183 Q E A D I S G Y I P N G E M D L V G I P G K R S E R F Y E C C K E P Y P D V T F T V T M R R R R T L Y n a C h r a l p h a 7  
 196 V K S D R S V F M N Q G E M E L L G V L P Y F R E - F S M E S S N Y Y A E M K F Y V V I R R R R P L F 5 - H T 3 A  
 194 I Q H D K K A F L N D S E M E L L S V S S T Y S I - L Q S S A G G F - A Q I Q F N V V M R R R H P L V 5 - H T 3 B

232 S I A L L V P A E A L L L A D V C G G L L P L R A I E R I G Y K V T L L L S L V L H S S L V Q A T C H 0 6 5  
 233 Y G L N L L I P C V L I S A L A L L Y F L L P A D S G E K I S L G I T L L L S L T V F M L L V A E I n a C h r a l p h a 7  
 245 Y V V S L L L P S I F L M V M D I V G F Y L P P P N S G E R V S F K I T L L L G Y S V F L I I V S D T 5 - H T 3 A  
 242 Y V V S L L L I P S I F L M V M D I V G F Y L P P P N C R A R I V F K T S V L V G Y T V F R V M M S N Q 5 - H T 3 B

2

M3

282 L P S S S S C N P L L I Y Y F T I L L L L L F L S T I E T V L A G L L A R G N L G A K S G P S P A T C H O 6 5  
 283 M P A T S D S V P L I A Q Y F F A S T M I I V G L S V V T V I V L Q V H H D P D G G K M P K W T R N A C h r a l p h a 7  
 295 L P A T A I G T P L I G V Y F F V V C M A L L V I S L A E T I F I V R L V H K Q D L Q Q P V P A W L R 5 - H T 3 A  
 292 V P R S V G S T P L I G H F F T I C M A F L V L S L A K S I V L V K F L H D E Q R G G Q E Q P - - - 5 - H T 3 B

332 P - - - - - R G E Q R E H G N P G P H P A E E P S R G V K G S Q R S W P E T A D R I F T C H O 6 5  
 333 V I L L N W C A M F L R M K R P G E D K V R P A C Q H K Q R C S L A S V E M S A V A P P P A S N G N A C h r a l p h a 7  
 345 H L V L E R I A M L L C L R E Q S T S Q - R P P A T S Q A T K T - - D - - D C S A M G N H C S H M G 5 - H T 3 A  
 339 - - - - - F L C L R G D T D A D - R P R V E P R A Q R A V V T - - E S S L Y G E H L A Q P G 5 - H T 3 B

M4

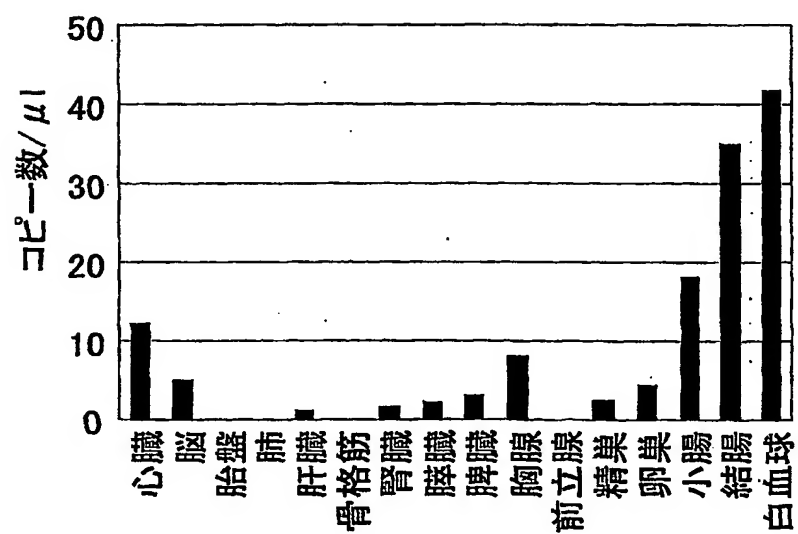
370 F L V Y V V - - - - - G V L C T Q F - - - - - T C H O 6 5  
 383 N L L Y I G F R G L D G V H C V P T P D S G V V C G R M A C S P T H D E H L L H G G Q P P E G D P D N A C h r a l p h a 7  
 390 G P Q - - D F E K S P R D R C S P P P - - - - - P P R E A S L A 5 - H T 3 A  
 377 T L K - - E - - - - - - - - - - - - - - - 5 - H T 3 B

383 - - - - - V F A G I - - - - - W M W A A C K S D A A P G E A - - - - - T C H O 6 5  
 433 L A K I L E H V R Y I A N R F R C Q D E S B A V C S E W K F A A C V V D D R L C L M A F S V P T I C N A C h r a l p h a 7  
 415 V C G L L Q E L S S I R Q F L E K R D E I R E V A R D W L R V G S V L D K L L F H I Y L L A V L A Y 5 - H T 3 A  
 381 - - - - - V W S Q L Q S I S N Y L Q T Q D Q T D Q Q E A E W L V L L S R F D R L L F Q S Y L F M L G I Y 5 - H T 3 B

403 - - - - - - - - - - A P H G R R P R L T C H O 6 5  
 483 T I G I L M S A P N F V B A V S K D F A N A C h r a l p h a 7  
 465 S I T L V M L W S I W - - - - - Q Y A 5 - H T 3 A  
 428 T I T L C S L W A L W - - - - - G G V 5 - H T 3 B

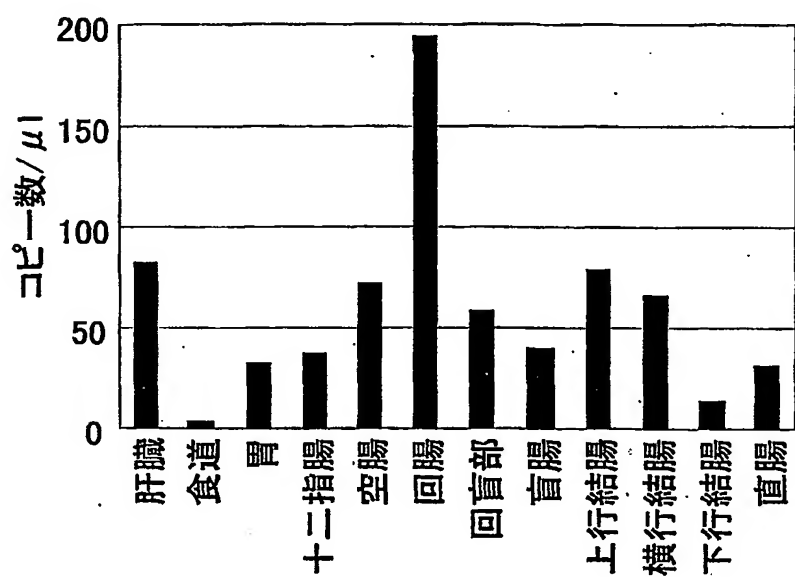
3 / 8

図 3



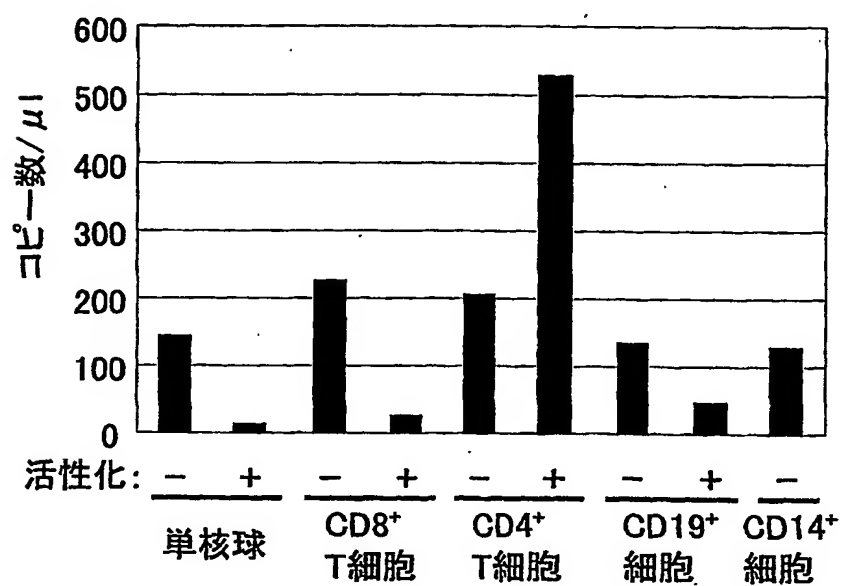
4 / 8

図 4



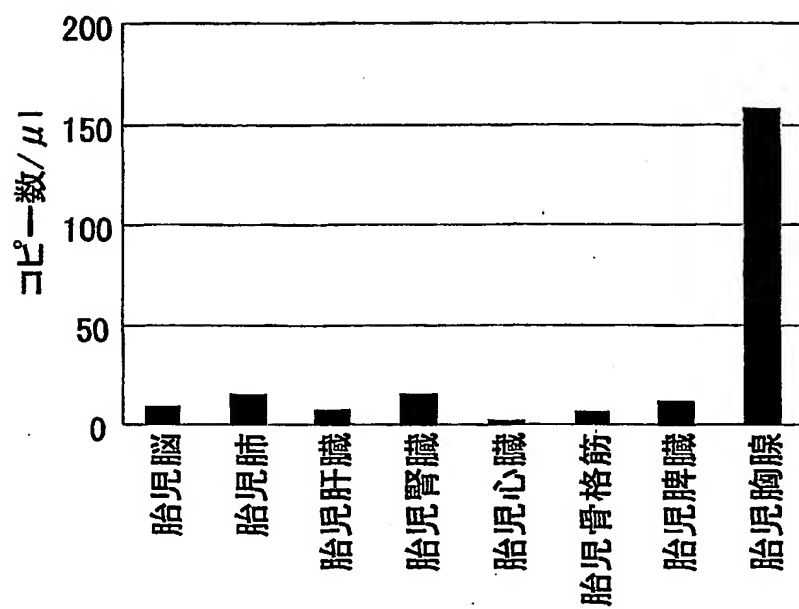
5/8

図 5



6 / 8

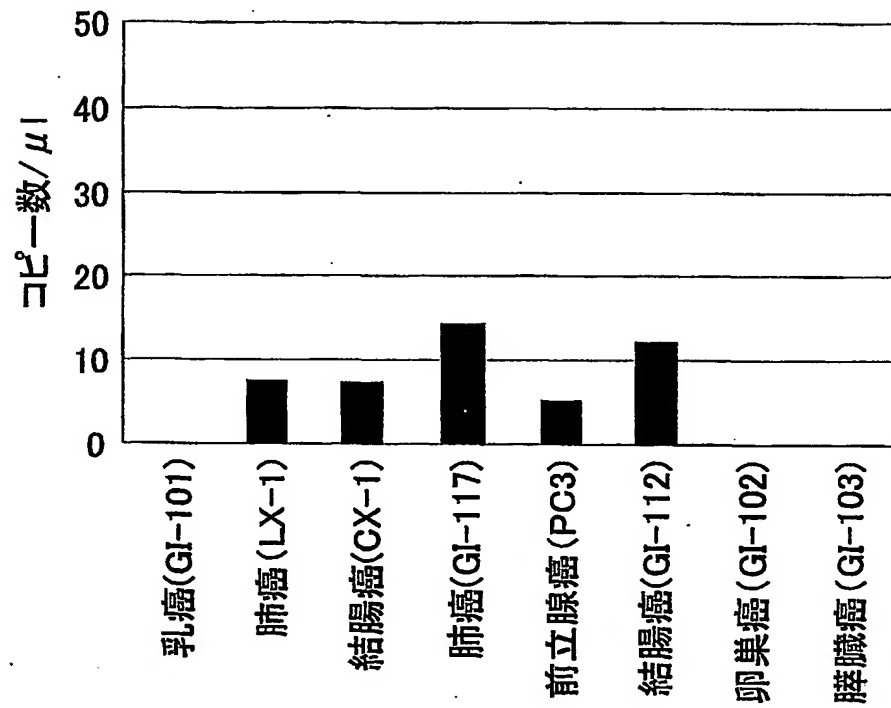
図 6





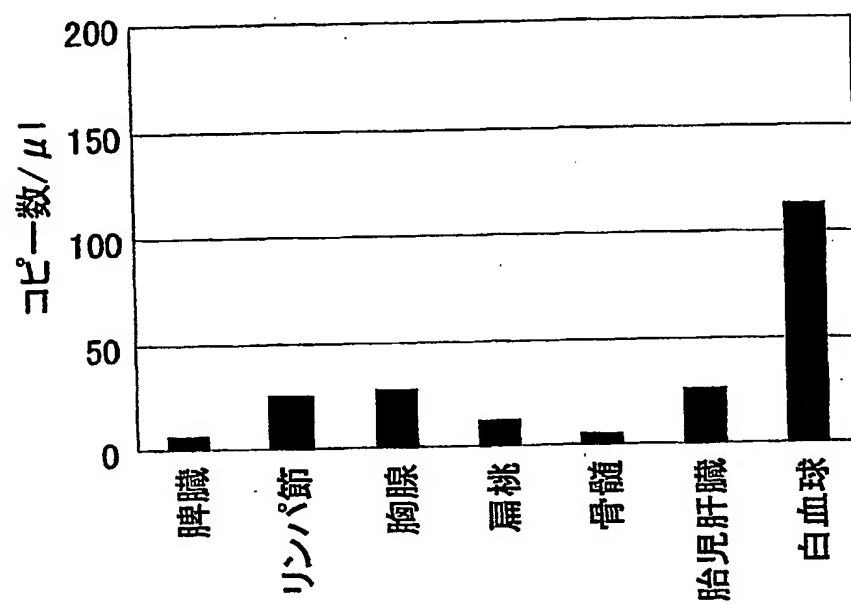
7 / 8

図 7



8 / 8

図 8



## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemicals Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> P02-0001PCT

<150> JP 2001-022505

<151> 2001-01-30

<150> JP 2001-390239

<151> 2001-12-21

<160> 16

<210> 1

<211> 411

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Ala Leu Trp Ser Leu Leu His Leu Thr Phe Leu Gly Phe Ser Ile

1 5 10 15

Thr Leu Leu Leu Val His Gly Gln Gly Phe Gln Gly Thr Ala Ala Ile

20 25 30

Trp Pro Ser Leu Phe Asn Val Asn Leu Ser Lys Lys Val Gln Glu Ser

35 40 45

Ile Gln Ile Pro Asn Asn Gly Ser Ala Pro Leu Leu Val Asp Val Arg

2/10

50	55	60	
Val Phe Val Ser Asn Val Phe Asn Val Asp Ile Leu Arg Tyr Thr Met			
65	70	75	80
Ser Ser Met Leu Leu Leu Arg Leu Ser Trp Leu Asp Thr Arg Leu Ala			
85	90	95	
Trp Asn Thr Ser Ala His Pro Arg His Ala Ile Thr Leu Pro Trp Glu			
100	105	110	
Ser Leu Trp Thr Pro Arg Leu Thr Ile Leu Glu Ala Leu Trp Val Asp			
115	120	125	
Trp Arg Asp Gln Ser Pro Gln Ala Arg Val Asp Gln Asp Gly His Val			
130	135	140	
Lys Leu Asn Leu Ala Leu Thr Thr Glu Thr Asn Cys Asn Phe Glu Leu			
145	150	155	160
Leu His Phe Pro Arg Asp His Ser Asn Cys Ser Leu Ser Phe Tyr Ala			
165	170	175	
Leu Ser Asn Thr Ala Met Glu Leu Glu Phe Gln Ala His Val Val Asn			
180	185	190	
Glu Ile Val Ser Val Lys Arg Glu Tyr Val Val Tyr Asp Leu Lys Thr			
195	200	205	
Gln Val Pro Pro Gln Gln Leu Val Pro Cys Phe Gln Val Thr Leu Arg			
210	215	220	
Leu Lys Asn Thr Ala Leu Lys Ser Ile Ile Ala Leu Leu Val Pro Ala			
225	230	235	240
Glu Ala Leu Leu Leu Ala Asp Val Cys Gly Gly Leu Leu Pro Leu Arg			
245	250	255	
Ala Ile Glu Arg Ile Gly Tyr Lys Val Thr Leu Leu Leu Ser Tyr Leu			
260	265	270	
Val Leu His Ser Ser Leu Val Gln Ala Leu Pro Ser Ser Ser Ser Cys			
275	280	285	

3/10

Asn Pro Leu Leu Ile Tyr Tyr Phe Thr Ile Leu Leu Leu Leu Leu Phe  
 290 295 300  
 Leu Ser Thr Ile Glu Thr Val Leu Leu Ala Gly Leu Leu Ala Arg Gly  
 305 310 315 320  
 Asn Leu Gly Ala Lys Ser Gly Pro Ser Pro Ala Pro Arg Gly Glu Gln  
 325 330 335  
 Arg Glu His Gly Asn Pro Gly Pro His Pro Ala Glu Glu Pro Ser Arg  
 340 345 350  
 Gly Val Lys Gly Ser Gln Arg Ser Trp Pro Glu Thr Ala Asp Arg Ile  
 355 360 365  
 Phe Phe Leu Val Tyr Val Val Gly Val Leu Cys Thr Gln Phe Val Phe  
 370 375 380  
 Ala Gly Ile Trp Met Trp Ala Ala Cys Lys Ser Asp Ala Ala Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Glu Ala Ala Pro His Gly Arg Arg Pro Arg Leu  
 405 410

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1233

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

atggccctat ggtccctgct ccattcacc ttctggggg tcagcattac ctgctgttg 60  
 gtccacgggc agggcttcca agggacagca gccatctggc catccctctt caacgtcaac 120  
 ttgtccaaga aggttcagga aagcatccag atcccgaaac atgggagtgc gccctgtctc 180  
 gtggaigtgc ggggtgttgt ctccaacgtg tttaatgtgg acatccttgc atacacaatg 240  
 tcttccatgc tgctgcttag gctgtcctgg ctggacactc gcctggcctg gaacactagt 300  
 gcacacccgc ggcacgccaat cagctgccc tgggagtctc tctggacacc aaggctcacc 360

4/10

atcctggagg cgctctgggt ggactggagg gaccagagcc cccaggctcg agtagaccag 420  
gacggccacg tgaagctcaa cctggccctc accacggaga ccaactgcaa ctttgagctc 480  
ctccacttcc cccgggacca cagcaactgc agcctcagct tctacgtct cagcaacacg 540  
gcatggagt tagagtcca ggcccacgtg gtgaacgaga ttgtgagtgt caagagggaa 600  
tacgtagttt atgactgaa gacccaagtc ccaccccagc agctgggtgcc ctgcttccag 660  
gtgacgtga ggctgaagaa cacggcgctc aagtccatca tcgtctctt ggtgcctgca 720  
gaggcactgc tgttggtga cgtgtcggg ggttgcgtgc cctccgggc cattgagcgc 780  
ataggctaca aggtgacatt gctgtgagt tacctcgtcc tccactcctc cctggtgcag 840  
gccctgccc gctcctctc ctgcaaccca ctgctcattt actacttcc catcctgtg 900  
ctgtgtctt tctcagcac catagagact gtgtgtgtg ctgggtgtg gggccgggc 960  
aaccttgggg ccaagagcgg cccagccca gcccagagag gggaacagcg agagcacggc 1020  
aaccagggc ctcatcctgc tgaagagccc tccagaggag taaaggggtc acagagaagc 1080  
tggcctgaga ctgtgaccg catcttctc ctgtgtatg tggttgggt gctgtgcacc 1140  
caattcgtct ttgcaggaat ctggtgtgg gcagcgtgca agtctgacgc agcccttga 1200  
gaggctgcac cccatggcag gcggcctaga ctg 1233

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 3

caagtgcacg gcccacaaagt cctt

24

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 26

5/10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 4

ggtggcttaa tccagaggcc ctgtca

26

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 5

gcagctgcct ctggctaatt gctcag

26

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 6

6/10

atttaggtga cactatag

18

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 7

aatacgactc actataggg

19

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 8

ctggaacact agtgcacacc

20

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence



7/10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 9

gtaaatgagc agtgggttgc

20

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 10

acacggcgct caagtcctc a

21

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 11

accgcatctt ctctctcgtg t

21

&lt;210&gt; 12

8/10

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 12

cgtgggcctg gaactctaac t

21

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1429

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 13

gcagctgcct ctggctaatt gctcagctgc cagagaagtg actggaatag aggttgtagc	60
ttaggcaccg ctgctccctc cagtcctcc gtgcagccga tgaiggccct atggccctg	120
ctccatctca ccttcctggg gttcagcatt accttgctgt tggccacgg gcaggcttc	180
caaggacag cagccatctg gccatccctc ttaacgtca actgtccaa gaaggctcag	240
gaaagcatcc agatcccgaa caatgggagt gcgccctgc tctggatgt gcgggtgtt	300
gtctccaacg tgtttaatgt ggacatccg cgatacaca tgtcctccat gctgtgctt	360
aggctgtctt ggctggacac tcgctggcc tggaaacta gtgcacacc gcggcacgcc	420
atcacgtgc cctgggagtc tctctggaca ccaaggctca ccatcctgga ggctcttg	480
gtggactgga gggaccagag ccccaggct cgagtagacc aggacggcca cgtgaagctc	540
aacctggccc tcaccacgga gaccaactgc aactttgagc tctccactt ccccgggac	600
cacagcaact gcagcctcag ctctacgtt ctacagcaaca cggcgaatga gttagagttc	660
caggcccacg tggatgaaga gatgtgagt gtcaagagg aatacgtagt ttatgatctg	720
aagacccaag tcccaccca gcagctggtg cctgtcttc aggtgacgt gaggtgaag	780

9/10

aacacggcgc tcaagtccat catcgtcttc ttggtgcctg cagaggcact gctgttggct 840  
gacgtgtgcg ggggttgcg gcccctccgg gccattgagc gcataggcta caaggtgaca 900  
ttgtgtctga gttacctcgt cctccactcc tccctgggtg aggccctgcc cagctcctcc 960  
tcttgaacc cactgtcat ttactacttc accatcctgc tgetgtgtct ctccctcagc 1020  
accatagaga ctgtgtgtgt ggctgggctg ctggcccggg gcaaccttgg ggccaagagc 1080  
ggccccagcc cagccccgag aggggaacag cgagagcacg gcaaccagg gcctcatcct 1140  
gctgaagagc cctccagagg agtaaagggg tcacagagaa gctggcctga gactgtgac 1200  
cgcatcttct tctcgtgta tgtggttggg gtgctgtgca cccaattcgt ctttgcagga 1260  
atctggatgt gggcagcgtg caagtctgac gcagcccctg gagaggctgc accccatggc 1320  
aggcggccta gactgtaaag gggcagggcc tgggctgcac acctaggat gaagtttgc 1380  
ttcccatggc tgggggcggg ccatgacagg gcctctggat taagccacc 1429

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 14

tccctcttca acgtcaactt gtc

23

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

10/10

<223> Primer

<400> 15

acaaacaccc gcacatcca

19

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 16

caggaaagca tccagatccc gaacaat

27

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00636

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, C07K14/705, C07K16/28, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P25/00, C12P21/02, G01N33/15, G01N33/50 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, C07K14/705, C07K16/28 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01/68849 A2 (Pharmacia & Upjohn Co.), 20 September, 2001 (20.09.01), Claims; sequence Nos. 41, 92 & AU 200147330 A	3-5, 7-14, 17-18, 21-23, 25-26
X	ADAMS MD. et al., EST16750 Aorta endothelial cells, TNF alpha-treated Homo sapiens cDNA 5'end, mRNA sequence. GenBank, 18 April, 1997 (18.04.97), Accession AA304052	3-5, 7-14, 17-18, 21-23, 25-26
X	HILLER, L., et al., ageneration and analysis of 280,000 human expressed sequence tags, Genome Res. 1996, Vol.6, No.9, pages 807 to 828 & HILLER, L., et al., zq69b05.s1, GenBank, 27 January, 1997 (27.01.97), Accession AA205715	3-5, 7-14, 17-18, 21-23, 25-26
A	MIYAKE, A. et al., Molecular Cloning of Human 5- Hydroxytryptamine <sub>2</sub> receptor: Heterogeneity in Distribution and Function among Species, Mol. Pharmacol., 1995, Vol.48, pages 407 to 416	1-14, 17-18, 21-23, 25-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 April, 2002 (10.04.02)		Date of mailing of the international search report 23 April, 2002 (23.04.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00636

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVIES PA, et al., The 5-HT <sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function, NATURE, 1999, Vol.397, No.28, pages 359 to 363	1-14, 17-18, 21-23, 25-26
A	BOULTER J. et al., $\alpha 3$ , $\alpha 5$ , and $\beta 4$ : Three Members of the Rat Neutral Nicotinic Acetylcholine Receptor-related Gene Family Form a Gene Cluster, J. Biol. Chem., 1990, Vol.265, No.8, pages 4472 to 4482	1-14, 17-18, 21-23, 25-26
A	WO 00/73431 A2 (Pharmacia & Upjohn Co.), 07 December, 2000 (07.12.00), Full text & AU 200049802 A & EP 1180142 A2	1-14, 17-18, 21-23, 25-26

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00636

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 24, 30

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy or diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT

2. ☒ Claims Nos.: 15-16, 19-20, 27-31

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "compound and its salt" as set forth in the above claims, it is completely unknown what specific compounds are involved in the scope thereof and what are not. Thus these claims are described in an extremely unclear manner.

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00636

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

Such being the case, no meaningful international search can be made on these claims.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/00636

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 14/705, C07K 16/28, A61K 38/00, A61K 45/00, A61K 48/00, A61P 25/00, C12P 21/02, G01N 33/15, G01N 33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 14/705, C07K 16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST7711 (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 01/68849 A2 (PHARMACIA & UPJOHN CO) 2001.09.20., 特許請求の 範囲、配列番号41及び92 & AU 200147330 A	3-5, 7-14, 17-18, 21-23, 25-26
X	ADAMS MD. et al., EST16750 Aorta endothelial cells, TNF alpha-treated Homo sapiens cDNA 5' end, mRNA sequence. GenBank, 1997.04.18., Accession AA304052	3-5, 7-14, 17-18, 21-23, 25-26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.04.02

国際調査報告の発送日

23.04.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	HILLER, L., et al., ageneration and analysis of 280,000 human expressed sequence tags, Genome Res. 1996, Vol. 6, No. 9, p. 807-828 & HILLER, L., et al., zq69b05. s1, GenBank, 1997. 01. 27., Accession AA205715	3-5, 7-14, 17-18, 21-23, 25-26
A	MIYAKE, A. et al., Molecular Cloning of Human 5-Hydroxytryptamine receptor: Heterogeneity in Distribution and Function among Species, Mol. Pharmacol., 1995, Vol. 48, p. 407-416	1-14, 17-18, 21-23, 25-26
A	DAVIES PA, et al., The 5-HT <sub>2B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function, NATURE, 1999, Vol. 397, No. 28, p. 359-363	1-14, 17-18, 21-23, 25-26
A	BOULTER J. et al., $\alpha 3$ , $\alpha 5$ , and $\beta 4$ : Three Members of the Rat Neutral Nicotinic Acetylcholine Receptor-related Gene Family Form a Gene Cluster, J. Biol. Chem., 1990, Vol. 265, No. 8, p. 4472-4482	1-14, 17-18, 21-23, 25-26
A	WO 00/73431 A2 (PHARMACIA & UPJOHN CO) 2000. 12. 07., 全文 & AU 200049802 A & EP 1180142 A2	1-14, 17-18, 21-23, 25-26

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 24, 30 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
前記請求の範囲の発明は、人の身体の治療方法又は診断方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 15-16, 19-20, 27-31 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
前記請求の範囲に記載の「化合物又はその塩」について、具体的にはどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。